

## **BAB III. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Universitas Muhammadiyah Malang, Jawa Timur. Penelitian ini akan dilaksanakan selama 3 bulan (September – November 2017).

### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow cabinet* (LAFC), jarum ose, pipet, spatula, bunsen, tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, *beaker glass*, rak tabung reaksi, rak penyimpanan, *refrigerator*, inkubator, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, *shaker*, bak plastik, masker laboratorium, sarung tangan laboratorium, alat tulis dan alat dokumentasi.

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri *Rhizobium* sp. koleksi Dr. Ir. Saidatul Idiyah MP., botol plastik (biru, coklat, bening, putih), botol kaca, karet, aluminium foil, kapas, plastik wrap, media berupa pepton cair (difco bacto pepton dan  $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), agar mikrobiologi, aquades steril, alkohol 70%, spirtus, larutan clorox.

### **3.3 Rancangan Percobaan**

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Universitas Muhammadiyah Malang, Jawa Timur dengan menggunakan rancangan Split Plot yang diatur secara acak kelompok. Petak utama adalah perbedaan suhu simpan pupuk hayati *Rhizobium* sp. cair, S1 = 4 °C (di *refrigerator*) disimpan di dalam kulkas, S2 = 25 °C (mewakili daerah Kepanjen) disimpan di laboratorium dan S3 =

32 °C (mewakili daerah Lamongan) disimpan di dalam inkubator dan anak petak adalah jenis kemasan pupuk hayati *Rhizobium* sp. cair, K1 = botol kaca, K2 = botol plastik bening (jenis plastik HDPE), K3 = botol plastik warna biru (jenis plastik PET), K4 = botol plastik warna coklat (jenis plastik PET), dan K5 = botol plastik warna putih (jenis plastik HDPE). Setiap perlakuan diulang 3 kali, sehingga terdapat 45 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 5 sampel.

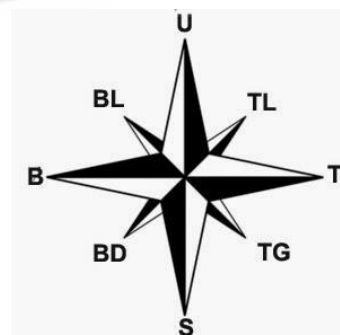
Ulangan I			Ulangan II			Ulangan III		
S1	S3	S2	S2	S3	S1	S3	S1	S2
○○○○○ K3	○○○○○ K4	○○○○○ K5	○○○○○ K2	○○○○○ K1	○○○○○ K3	○○○○○ K4	○○○○○ K3	○○○○○ K2
○○○○○ K1	○○○○○ K2	○○○○○ K3	○○○○○ K5	○○○○○ K5	○○○○○ K4	○○○○○ K2	○○○○○ K5	○○○○○ K5
○○○○○ K5	○○○○○ K3	○○○○○ K4	○○○○○ K3	○○○○○ K3	○○○○○ K1	○○○○○ K5	○○○○○ K1	○○○○○ K1
○○○○○ K2	○○○○○ K5	○○○○○ K1	○○○○○ K4	○○○○○ K2	○○○○○ K3	○○○○○ K1	○○○○○ K4	○○○○○ K3
○○○○○ K4	○○○○○ K1	○○○○○ K2	○○○○○ K1	○○○○○ K4	○○○○○ K2	○○○○○ K3	○○○○○ K2	○○○○○ K4

Gambar 3. Denah Penelitian

Keterangan :

S = Suhu simpan

K = Kemasan pupuk



### 3.4 Metode Pelaksanaan

#### 3.4.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat seperti pipet, tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, gelas piala, spatula sebelum disterilisasi terlebih dahulu dicuci bersih setelah itu dibungkus dengan kertas kemudian dimasukkan ke dalam plastik yang tahan panas. Sterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 60 menit. Sterilisasi *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) dilakukan dengan menggunakan lampu UV selama  $\pm 60$  menit lalu di blower selama  $\pm 30$  menit kemudian sebelum digunakan disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Sedangkan botol kaca dan botol plastik dicuci bersih dan disterilisasi menggunakan larutan clorox sebanyak 2 tutup botol bayclin yang ditambahkan kedalam seed box yang berisi air, kemudian direndam selama 1x24 jam (Lampiran 3).

Sterilisasi bahan sama dengan sterilisasi alat yakni menggunakan *autoclave* selama 25 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Bahan yang disterilisasi media pepton dan aquades. Selain itu bahan lain yang perlu dipersiapkan tanpa melakukan sterilisasi adalah alkohol 70% (Lampiran 3).

#### 3.4.2. Pembuatan Media Pepton Cair

Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri adalah media pepton cair. Pembuatan stok media pepton cair dilakukan dengan mencampur 0,4 % difco bacto pepton dan 2 mM Mg SO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O dan aquades dalam gelas piala 1000 ml, kemudian ditambahkan aquades steril hingga volume 1000 ml dan dididihkan di dalam *microwave*. Kemudian media dituang ke dalam erlenmeyer 250 ml dan masing-masing sebanyak 200 ml. Bagian mulut erlenmeyer dibakar pada nyala

bunsen dan ditutup dengan aluminium foil yang dilewatkan di atas nyala bunsen dan plastik tahan panas lalu diikat dengan karet gelang. Selanjutnya dilakukan proses sterilisasi menggunakan *autoclave* selama 25 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Kegiatan ini dilakukan dalam *laminar air flow cabinet* (Lampiran 4).

#### 3.4.3. Pembuatan Pupuk Hayati Cair

Media bacto pepton 200 ml pada erlenmeyer yang telah disterilkan dan didinginkan  $\pm 1$  hari kemudian dibuat pupuk hayati cair dengan cara mengambil dua ose bakteri dari cawan petri dengan jarum ose dan dikulturkan pada media bacto pepton cair. Jarum ose selalu disterilkan setiap kali digunakan dengan mencelupkan dalam alkohol kemudian dibakar pada nyala bunsen sampai merah dan didinginkan menggunakan alkohol 70%. Kemudian pupuk hayati cair tersebut dishaker selama 7 hari dengan kecepatan 130 rpm. Setelah dishaker pupuk hayati cair tersebut dituangkan pada botol sampel sesuai perlakuan sebanyak masing-masing 100 ml. Kegiatan ini dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Pupuk hayati cair tersebut kemudian disimpan selama 1 bulan pada tiga tempat penyimpanan yaitu: *refrigerator*, rak penyimpanan dalam laboratorium dan inkubator (Idiyah, 2004) (Lampiran 5).

#### 3.4.4. Penghitungan Bakteri

Media yang digunakan untuk perbanyakan bakteri adalah berupa bacto pepton agar dengan cara mencampur 0,4 % difco bacto pepton, 2 mM Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, agar mikrobiologi dan aquades dalam erlenmeyer 500 ml. Selanjutnya

dilakukan proses sterilisasi media bacto pepton agar menggunakan *autoclave* selama 25 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm. Beberapa cara dapat digunakan untuk menghitung atau mengukur jumlah jasad renik didalam suatu suspensi atau bahan, salah satunya yaitu perhitungan jumlah sel dengan metode hitung cawan. Prinsip dari metode ini adalah jika sel mikroba masih hidup ditumbuhkan pada medium agar maka sel tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung tanpa menggunakan mikroskop. Cara pemupukan kultur dalam hitungan cawan yaitu dengan metode sebar (*spread plate*) (Lampiran 6). Penghitungan bakteri dilakukan dengan metode dilusi, yaitu:

- a. Mengambil 1 ml sampel yang terdapat pada botol sampel dengan menggunakan pipet steril kemudian dipindahkan kedalam 9 ml larutan aquades steril yang terdapat dalam tabung reaksi (pengenceran  $10^{-1}$ ).
- b. Mengulangi langkah pada poin a pada pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-9}$ .
- c. Mengambil 100  $\mu$  larutan sampel yang terdapat pada tabung reaksi ke 9 (pengenceran  $10^{-9}$ ) dan diinokulasikan pada cawan petri yang terdapat media agar steril.
- d. Membakar spreader yang sebelumnya telah dicelupkan dalam alkohol dan biarkan sampai dingin.
- e. Menyebarkan sampel bakteri dengan spreader secara merata dan membiarkan sampai permukaan agar mengering.
- f. Menyimpan dalam inkubasi pada suhu 25 °C selama 1 hari (Yunita dkk, 2015).

#### 2.4.5. Pengamatan

Perkembangan bakteri *Rhizobium* sp. diamati dengan mengukur parameter, yaitu:

1. Jumlah Koloni yang dibiakkan diamati dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). TPC merupakan metode yang digunakan untuk menghitung koloni mikroorganisme dalam sebuah cawan (*plate*) pada berbagai pengenceran. Perhitungan TPC dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri hasil perhitungan dilakukan faktor pengencer. Cara menghitung jumlah bakteri dalam cawan petri adalah dengan melakukan pengamatan secara langsung pada cawan petri untuk melihat adanya koloni bakteri, kemudian menghitung jumlah koloni bakteri tersebut. Penentuan jumlah bakteri per ml dengan menggunakan rumus :  $\text{Jumlah bakteri per ml sampel} = \text{jumlah koloni/faktor pengenceran}^n$ .
2. Bentuk koloni bakteri diamati dengan cara melihat bentuk koloni bakteri yang terdapat pada cawan petri hasil penanaman, pengamatan dilakukan 24 jam setelah penanaman pada media bacto pepton agar dalam cawan petri.
3. Warna pupuk hayati cair diamati dengan cara melihat warna pada masing-masing perlakuan setelah penyimpanan.
4. Kecepatan bakteri dalam membentuk koloni diamati dengan cara melihat pertumbuhan koloni bakteri pada cawan petri yang telah ditanami bakteri selama 3 hari. Pengamatan dilakukan setiap harinya untuk mengetahui kecepatan tumbuh bakteri tersebut.

#### 3.4.6. Analisis dan Pengujian Data

Data yang terkumpul dianalisis secara bertahap sesuai dengan tujuan penelitian. Parameter jumlah bakteri dianalisis menggunakan anova dan diuji lanjut menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf 5%. Selanjutnya, parameter bentuk koloni, warna pupuk hayati cair dan kecepatan tumbuh dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif.

